

значительное уменьшение предстательной железы, чем при использовании тамерита, однако в течение 1-го месяца лечения тамерит вызывает более скорое сокращение объема железы; уровень PSA в сыворотке крови снижается при приеме обоих препаратов, но при использовании тамерита в большей степени; тамерит, в отличие от финастерида, улучшает половую функцию.

Предположительно, тамерит обладает отличным от финастерида механизмом действия на патогенез ДГТДЖ. Очевидно, клинический эффект тамерита обусловлен в первую очередь снижением выраженности бактериальных и асептических воспалительных компонентов заболевания и, возможно, снижением продукции ростовых факторов и антиоксидантной активностью.

## **ВЕРОЯТНОСТЬ МУТАЦИЙ ГЕНА p53 В ТЕХНОЛОГИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ**

*Макеев О.Г., Измайлов И.Х., Тарасевич А.А., Костюкова С.В.,  
Зубанов П.С., Улыбин А.И., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Ястребов А.П.*

Уральская государственная медицинская академия,  
Лаборатория молекулярных медицинских технологий  
Средне-Уральского научного центра  
Российской Академии Медицинских Наук

В настоящее время получило широкое распространение использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) фетального происхождения в качестве аллогенных трансплантатов для лечения тяжелых форм тканевой недостаточности. Такой подход основывается на данных исследований, свидетельствующих об отсутствии у ЭСК, извлеченных из абортусов до 14 недели эмбрионального развития, экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Тем самым утверждается, что введенные в организм клетки не должны быть отторгнуты.

Однако клеточная терапия (если она действительно клеточная, а не метаболическая - за счет продуктов распада) предусматривает деление и последующую дифференцировку ЭСК в тканях пациента с образованием замещающих специализированных структур. А дифференцировка клеток сопровождается не только клеточной специализацией, но и проявлением признаков генотипа организма, из которого они были изъяты. Отсюда неизбежно следует экспрессия антигенов ГКГ и активация иммунной системы пациента, направленная на отторжение чу-

жородного белка. Это обуславливает повреждение и распад введенных клеток и приводит к «триггерному» эффекту, активирующему тканевой метаболизм за счет продуктов распада. Последний представляется пациентам как результат клеточной терапии.

Подобный подход впервые научно обосновал французский физиолог Шарль Броун-Секар, который еще в 1889 г. сделал сообщение об омолаживающем эффекте инъекций клеток и вытяжек из тканей собак и морских свинок. Эксперименты он выполнял на себе и впервые описал феномен снижения качества и продолжительности эффекта с каждым последующим введением. В дальнейшем, на фоне развития системной воспалительной реакции, Броун-Секар отказался от инъекций, что спровоцировало резкое ускорение темпов старения и гибель ученого в течение трех недель.

Таким образом, клеточная терапия генетически чужеродным материалом, при интактной функции иммунной системы, по-сути не отличается от метаболической. Важным представляется то, что иммуносупрессивная терапия, к которой нередко прибегают для приживления клеток, обеспечивает статистически значимый тератогенный эффект.

Между тем, на возможность образования эмбриональных опухолей из экзогенных ЭСК на фоне иммунодефицитного состояния указывали еще основоположники клеточной терапии – Thomson J.A. (1998) и Reubinoff B. (2000). В последние годы это нашло подтверждение в экспериментах Wakitani S. (2003), Erdo F. (2003) и Asano T. (2003), наблюдавших гистологические признаки тератокарцином (зачатки зубов, волос) в месте введения в организм донорских ЭСК того же фенотипа. При этом частота спонтанного возникновения эмбриональных опухолей составляла по данным авторов от 25 до 30%. И хотя эксперименты были выполнены на иммунодефицитных безтимусных мышах, однако можно предположить, что значение опухолевой трансформации в условиях аллогенной трансплантации ЭСК при иммунодефицитных состояниях (ЭСК нередко используются для лечения подобных состояний) будут являться частым осложнением клеточной терапии. Поэтому применение фетальных тканей для терапевтических целей ни в одной стране мира не входит в перечень разрешенных медицинских процедур.

Альтернативой применения фетальных ЭСК служат собственные ЭСК взрослого человека. Однако на этом пути стоит ряд препятствий. Прежде всего это малая концентрация ЭСК в человеческом организме – от 1 : 10 тыс. у эмбриона и до 1 : 5 млн. – в пожилом возрасте. Поэтому выделить ауто ЭСК в количествах, достаточных для терапии, не всегда удается. Так же не всегда удаются пока попытки размножить

их в культуре, так как «взрослые» ЭСК в этих условиях уходят на дифференцировку с утратой свойств тотипотентности.

Поэтому в настоящее время к предпочтительной технологии относится перенос генетического материала в яйцеклетку, который иногда называют терапевтическим клонированием. Однако и здесь лежит комплекс проблем. Так, если клонирование животных в большинстве случаев воспроизводимо, то клонирование высших приматов и особенно человека в редких случаях завершается получением ЭСК.

В связи с тем, что одной из задач лаборатории молекулярных медицинских технологий является получение и отработка на доклиническом этапе культур для клеточной терапии, была поставлена методика, предусматривающая анализ мутаций генов, сопровождающих большинство опухолевых заболеваний человека.

В основе метода – ДНК-гибридизация с амплифицированной ДНК пациента и последующим анализом включения радиоактивно меченых дезоксирибонуклеотидов. Эта модификация позволила повысить чувствительность метода в 8-9 раз по сравнению со стандартной полимеразной цепной реакцией и дала возможность выявлять единичные мутантные молекулы.

В качестве праймеров для идентификации мутаций используются мутантные аналоги последовательностей ДНК гена-супрессора p53, проявляющиеся полным исчезновением активности белка p53: мутации в кодонах 248 (G-T, G-C, G-A), 175 (GC-AT) и 273 (GCG-ATG). Помимо p53 метод направлен на выявление онкогенов: Kras – в 61 кодоне (CAA и CGA), BRCA1 (делеция в 185 кодоне) и мутаций митохондриальной ДНК в 310 позиции (T-C).

Избранный набор мутаций, по данным литературы, типичен не менее чем для 98% всех опухолей человека. Мутантные ДНК выявляются в крови при наличии опухоли от 2 млн. клеток (размером до 1 мм), то есть задолго до клинической манифестации онкологического заболевания.

В нашем эксперименте были использованы ооциты 39 женщин, получаемые в процессе гормональной стимуляции по длинному протоколу в клинике экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). От одной женщины мы получали от одного до десяти ооцитов, не использованных в технологии ЭКО. В любом случае ооциты являются незаменимым материалом, так как в их цитоплазме содержится избыток матричных РНК всех 3000 генов, ответственных за рост зародыша на ранней стадии развития эмбриона.

В эксперименте использовали мононуклеары периферической крови одного донора, хранящиеся в нашем банке ДНК. По мере ис-

пользования моноклеоров производились неоднократные повторные заборы крови у данного донора.

Исследование включало три основных этапа:

I этап. Предподготовка. Состояла из трех подэтапов: подготовка фидерного слоя из мышинных фибробластов, подготовка ооцитов и клеток донора ядра.

II этап. Нуклеотрансфер и стимуляция к делению, включающий: разрезание ооцита микроскальпелем, подведение безъядерной части ооцита к клетке – донору ядра, слияние мембран клетки донора и ооцита посредством электрического импульса, культивирование на фидерном слое в среде MEM в модификации Дюльбекко и ФТС (10%) с ежедневным отслеживанием признаков деления (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Деление новообразованных клеток нам удалось наблюдать только в двух экспериментах из почти 200 успешных переносов ядра. В первом случае деление прекратилось после образования восьми клеток. Однако в другом эксперименте нам все же удалось достичь стадии образования бластоцисты.

III этап. Выделение клеток внутреннего образования 11 суточной бластоцисты и их культивирование, в том числе: разрушение бластоцисты 15-минутной обработкой буфером, содержащим трипсин, пересев кластеров круглых клеток на фидерный слой фибробластов и пересевы на новую среду и свежий фидерный слой посредством трипсинизации с отбором колоний, у которых отсутствуют признаки спонтанной дифференцировки (каждые 5-6 дней).

Принято считать, что тотипотентными являются клетки, не ограниченные барьером Хейфлика, составляющим примерно 60 пассажей культуры. Культура клеток, выделенная нами из бластоцисты, дала более 60 пассажей, подтвердив, тем самым, тотипотентность.

После пересевов наблюдалось образование колоний двух типов:

1 тип – сформированные клетками округлой формы, крупным ядром и выраженными нуклеолями. Клетки образуют плотно фиксированные на подложке колонии. По мере их увеличения наблюдается уплощение центра колонии и формирование наружного кольца из светлых клеток. После трипсинизации эти клетки отделяются от колоний, приобретая округлую форму.

2 тип колоний образован клетками, напоминающими карциноматозные. При пересеве клетки начинают быстро дифференцироваться.

По завершению культивирования были исследованы отработанные в процессе перевивки образцы законсервированных культуральных сред на предмет выявления в них фрагментов ДНК, несущих мутантный ген. Оказалось, что примерно с 9 пассажа в культуральной

среде стали появляться признаки мутаций в кодоне 248 G-T гена p53. Известно, что мутации в этом кодоне сопровождают более 50% всех опухолевых заболеваний человека, а во всех трех кодонах p53 – около 80%. Примечательно, что у донора ядра признаков мутаций ни гена p53, ни других генов не выявлено.

Анализ литературы, в частности китайских и южнокорейских источников, в которых подтверждено получение бластоцисты человека посредством нуклеотрансфера, к сожалению не содержит сведений о проведенных подобных исследованиях.

Важно отметить, что как деление новообразованной нуклеотрансфером клетки, так и образование бластоцисты, наблюдалось с использованием ооцитов только одной из 39 женщин. Это, по-видимому, может означать ошибочность общепризнанного мнения о том, что ооциты для нуклеотрансфера могут быть получены от любой женщины независимо от расы, возраста и др. После исследования крови этой женщины на предмет выявления мутаций, признаков мутаций в ее ядерном геноме найдено не было, но в митохондриальной ДНК, в частности в положении 310 Д-петли, была найдена мутация (Т-С). Последняя сопровождается до 15% всех опухолевых заболеваний человека. Других мутаций у донора ооцитов выявлено не было.

Полученные результаты могут рассматриваться пока только в качестве феномена, так как до сих пор остается неисследованным вопрос о взаимодействии геномов как непосредственно в живых тканях, так и ядерного и митохондриального в пределах одной клетки.

На основании проведенного эксперимента может быть позволено сделать некоторые выводы, которые в большой степени являются предварительными.

1. Для клеточной терапии могут быть использованы исключительно ЭСК, выделенные из организма самого пациента с последующим культивированием для их прямого наращивания или для использования в технологии терапевтического клонирования. Последняя позволяет получать значительные объемы эмбриональной клеточной массы без утраты тотипотентности.

2. Важным критерием отбора клеточного материала может служить определение мутаций генов, наиболее часто сопровождающих опухоли человека. Это в полной мере относится к исследованию как ядерной ДНК донора, так и митохондриальной ДНК женщины-реципиента в процессе выполнения технологии терапевтического клонирования.

3. При подтверждении наличия мутации, от применения терапии с использованием ЭСК следует отказаться.